



Desarrollo y validación de métodos analíticos para estandarización de fitofármacos con *Turnera diffusa* (damiana)

AURORA GARZA JUÁREZ*, JONATHAN PÉREZ MESEGUER*, RICARDO SALAZAR ARANDA*, MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS*, NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES*



Durante mucho tiempo, las plantas medicinales fueron el principal, e incluso el único, recurso de que disponían los médicos para tratamiento y control de enfermedades.¹ La OMS ha confirmado que 80% de la población mundial, especialmente de las áreas rurales de los países en desarrollo, usan las medicinas herbales para sus necesidades de salud. Para evaluar la eficacia de los productos naturales, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos, los cuales deben realizarse con la misma rigurosidad que los que se usan para los medicamentos tradicionales.

El reporte adecuado del contenido e identidad del producto natural que se evalúa es crítico, por lo que la identificación del material con el que se trabaja debe ser parte de estos ensayos.² Uno de los problemas para este tipo de ensayo clínico es la falta de información definida y completa acerca de la composición de los extractos. Una revisión de los artículos acerca de ensayos clínicos llevados a cabo con productos herbales

demostró que en sólo doce (15%) de 81 ensayos se menciona alguna prueba de cuantificación de contenido, y solamente tres (4%) ofrecen datos para comparar la cantidad encontrada frente a la esperada y, al menos para un constituyente, la variación estaba entre 80 y 113%; esto refleja que fue inadecuada la documentación para caracterizar el suplemento herbal.³

La mayoría de los productos herbolarios que se venden en México se contemplan como suplementos alimenticios y no como medicamentos o remedios herbolarios, por lo tanto no se les exige un control de calidad. Debido a esta problemática, y considerando que en México la herbolaria es una práctica médica desde tiempos prehispánicos, nuestro grupo de trabajo analizó, por medio de cromatografía en capa delgada (CCD), los productos herbolarios que se consumen más en nuestra región. Observamos que de 106 productos comerciales analizados, solamente 12% cumplió con los criterios cualitativos y semicuantitativos, asegurando en ellos la calidad cromatográfica.^{4,5} Por lo anterior, consideramos necesaria la investigación profunda y sistematizada de plantas medicinales que crecen en territorio nacional, para obtener

□ El presente artículo está basado en la investigación "Desarrollo y validación de métodos analíticos para estandarización de fitofármacos con *Turnera diffusa* (damiana)", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2010 en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2010.

* Departamento de Química Analítica. Facultad de Medicina, UANL, P.O. Box 2316, Sucursal Tecnológico, 64841, Monterrey, Nuevo León, México.

información necesaria que permita establecer los parámetros de análisis con métodos validados, los cuales posteriormente sean aplicados para determinar la calidad en productos que contengan estas plantas.

La damiana (*Turnera diffusa*) es una planta medicinal ampliamente utilizada en México con propiedades afrodisíacas, antihiper glucemiantes, antidepresivas y termogénicas, entre otras.^{6,7} Nuestro grupo ha demostrado su actividad antioxidante y hepatoprotectora.⁸ No hay métodos analíticos que permitan su control de calidad, por ello el objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar métodos analíticos para el control de calidad de los productos de dicha planta.

Materiales y métodos

Para los análisis por HPLC se usó un equipo Waters 2690 Alliance, con detector de arreglo de diodos (DAD) 2996, equipado con automuestreador, desgasificador y controlador de temperatura de columna. Para los análisis por RMN se usó un Bruker Avance DPX400 de 400 MHz. Los análisis en UV-vis se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU-7500, con arreglo de diodos. Las CCD se realizaron en placas de 0.2 mm espesor de sílica gel 60 F₂₅₄, Merck (Darmstadt, Alemania).

Para el análisis por HPLC se empleó una columna fase reversa C₁₈ AccQ Tag 150 x 3.9 mm, 4µm (Waters Corporation Milford, MA). Los solventes, grado HPLC, se adquirieron en Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). El agua desionizada se adquirió en Laboratorios Monterrey, S.A. de C.V. Los solventes grado reactivo se adquirieron en Fermont (Monterrey, N.L.). 2,2-Difenil-1-picril-hidracilo (DPPH) se adquirió en Sigma-Aldrich. *T. diffusa* (parte aérea) se colectó en Zuazua, N.L., México, en diciembre de 2005, para usarse en el aislamiento e identificación del biomarcador.

Un espécimen se depositó en el herbario de la Facultad de Biología de la UANL (voucher No.

23569). Diversas muestras de *T. diffusa* se colectaron en diferentes regiones de nuestro país, entre 2005 y 2009, para usarse en la obtención de huellas dactilares cromatográficas, las determinaciones de actividad antioxidante y en los estudios de aplicabilidad de los métodos analíticos desarrollados. Los productos comerciales se adquirieron en diversos establecimientos comerciales en la república mexicana, así como en Barcelona, España.

Métodos

Aislamiento e identificación de un biomarcador

Se tomaron 500 g de la parte aérea de *Turnera diffusa*, se secaron, molieron y se sometieron a extracción con MeOH (3 x 600 mL) por agitación a temperatura ambiente, durante una hora. Se realizó un fraccionamiento biodirigido del extracto que llevó al aislamiento del compuesto 1, cuya pureza e identificación se evidenció por CCD, HPLC-DAD y ¹HRMN.⁹

Determinación de la actividad antioxidante por medio del DPPH por CCD

Para la determinación cualitativa de la actividad antioxidante se usó el método del DPPH en CCD,⁸ y para la determinación cuantitativa se realizó de acuerdo a lo reportado por Leu¹⁰ con algunas modificaciones. Los extractos o compuestos se disolvieron en etanol, a una concentración de 1 mg/mL, de esta solución se prepararon soluciones en un intervalo de concentraciones entre 200 a 0.234 µg/mL; cada muestra de ensayo tenía 500 µL de la solución del extracto (o compuesto) a probar y 500 µL de una solución de DPPH (125 µM en etanol). La mezcla se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 517 nm. Se utilizó quercetina como control positivo, se graficó la correlación entre cada concentración y su porcentaje de reducción. La concentración, que redujo 50% del radical libre

DPPH, se calculó por interpolación. La actividad se expresó como EC_{50} .

Análisis por HPLC-DAD

La fase móvil consistió en ácido trifluoroacético 0.1% (solvente A) y metanol (solvente B). La velocidad de flujo fue de 0.4 mL/min. Se usó gradiente de elución, y el volumen de inyección fue de 10 μ L. Los espectros de absorción se adquirieron en un intervalo de 200-400 nm. Los cromatogramas se convirtieron a ASCII, y se exportaron, posteriormente, a Unscramble 9.8, para su procesamiento.

Cuantificación del biomarcador

Para resolver la señal del compuesto 1 se calculó la primera derivada de los cromatogramas a 350 nm con el algoritmo de Savitzky-Golay, con un suavizado de tres puntos y un polinomio de segundo grado. La cuantificación se realizó por el método de estándar externo; para ello se prepararon cinco estándares en un intervalo de 1 a 100 mg/L.

Preparación de las muestras para el desarrollo analítico

Las plantas recolectadas se secaron a temperatura ambiente. Las partes aéreas se molieron y se pasaron a través de un cedazo de malla 40. Se agitó 1 g de este polvo vigorosamente en vórtex, durante tres minutos, con una mezcla etanol: agua 9:1 (3 X 5 mL) a temperatura de laboratorio. Los extractos combinados se evaporaron a sequedad bajo vacío, 15 mg de cada extracto se disolvieron en 1 mL de DMSO, previo al análisis.

Estandarización del perfil cromatográfico

Para definir los componentes principales de *T. diffusa*, se obtuvieron los cromatogramas de las muestras colectadas. Cada muestra se sometió al proceso de extracción y análisis previamente des-

crito. Los cromatogramas obtenidos se analizaron para identificar las señales de mayor intensidad comunes en todas las muestras. La identificación se llevó a cabo en función al tiempo de retención, y con el espectro de absorción de cada señal.

Análisis quimiométrico

Se trabajó con los datos estandarizados de las áreas relativas de doce señales cromatográficas comunes en 19 muestras de colecta de *T. diffusa*. Las áreas relativas de los picos comunes se estandarizaron antes del análisis quimiométrico. Los datos de las áreas relativas estandarizadas se exportaron al Programa Unscramble 9.8, para ser procesados mediante análisis de componente principal (PCA), con el fin de construir el modelo quimiométrico y establecer el perfil cromatográfico de la planta.

Análisis de datos para correlacionar perfil cromatográfico y actividad antioxidante

La matriz inicial de calibración para el PLS1 consistió de 40 muestras, con 2780 variables "X", correspondientes a las respuestas obtenidas en los diferentes tiempos de retención. La variable "Y" consistió en el valor de actividad antioxidante de cada extracto, expresada como CE_{50} . Previo al análisis quimiométrico, se realizó la alineación de los cromatogramas con base en siete señales presentes en todas las muestras analizadas con intensidades relativamente altas.

Con el propósito de optimizar el modelo, diferentes métodos de pretratamiento de los cromatogramas fueron evaluados: corrección de la línea base, suavizado, selección de las regiones cromatográficas a utilizar y derivada de los cromatogramas. Como criterios de evaluación se consideraron los mejores valores del coeficiente de calibración y de validación (RMSC y RMSV). Para modelar la relación entre la capacidad antioxidante y los perfiles cromatográficos de los extractos de *T. diffusa*, se empleó el análisis de PLS1. Para elegir la mejor matriz de datos, se emplearon los mis-

mos criterios que para la optimización del modelo. La validación del modelo PLS se realizó mediante la validación cruzada.

Resultados y discusión

En el presente trabajo se realizó un desarrollo analítico integral de *T. diffusa* (damiana), que inició con el aislamiento, purificación, identificación y evaluación de la actividad antioxidante de un biomarcador de la planta, continuando con el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC-DAD, que puede servir tanto para su control de calidad como para el establecimiento de su identidad en productos comerciales que la contengan. Por último, se estableció una correspondencia entre la actividad antioxidante de la planta y su perfil cromatográfico.

La partición líquido-líquido de los extractos

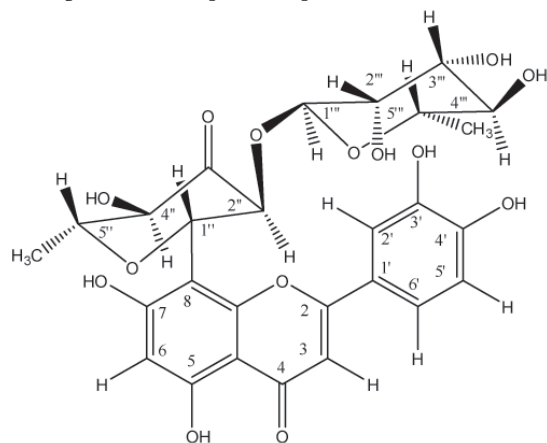


Fig. 1. Estructura de 1 aislado de *T. diffusa*.

metanólicos activos obtenidos de la parte aérea *T. diffusa* mostró que los extractos obtenidos con acetato de etilo y butanol tenían la mayor actividad antioxidante. Aunque en el extracto estaban presentes varios flavonoides, nuestra meta era aislar e identificar el o los compuestos con mayor actividad antioxidante, según el método del DPPH en CCD. El compuesto aislado 1 fue identificado por RMN en una y dos dimensiones como 8-C- β -[6-deoxi-2-O-(α -1-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulosido] de luteolina (figura 1).

Aunque este compuesto había sido previamente aislado de extractos de damiana, no se había reportado para el mismo ninguna actividad biológica.¹¹ La CE_{50} de este compuesto (9.62) fue similar a la de quercetina (7.77), y mucho mejor que la del butilhidroxitolueno (39.34).

Después del análisis de 40 ejemplares de damiana recolectados en México, encontramos que este compuesto estaba presente en todos éstos. Además, hasta ahora no ha sido reportado su aislamiento de otra especie vegetal. Por lo tanto, este C-glicósido puede ser considerado como un biomarcador de la planta, ya que es constituyente particular de esta especie, y da cuenta de la actividad antioxidante de la misma. Considerando lo anterior, se decidió desarrollar un método por HPLC-DAD, para cuantificar este compuesto en diversos ejemplares nativos de damiana y muestras comerciales, esto como una primera propuesta para control de calidad de los productos de esta planta. El compuesto de interés (t_R 19.5) coeluye con otro de t_R muy cercano (figura 2).

Se probaron distintas modificaciones al siste-

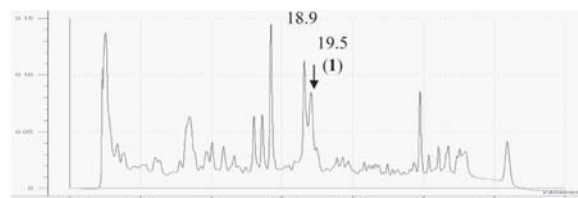


Fig. 2. Cromatograma del extracto de *T. diffusa*.

ma cromatográfico, pero en ningún caso se logró la resolución de los dos picos. Por ello se decidió usar el algoritmo de Savitzky-Golay para obtener la derivada primera ($1^{\circ}D$) de los cromatogramas, la cual se usó para el análisis posterior. La integración de la señal derivada se llevó a cabo al medir la distancia entre el cero y el mínimo, ya que es la más alejada de la señal cuya interferencia se quiere eliminar. El método se validó de acuerdo con los parámetros recomendados por la AOAC (12).

La curva de calibración fue lineal en el rango 1-100 mg/L. El coeficiente de correlación (r^2) fue 0.999. La ecuación de la curva de regresión fue

$^1D_{350nm} = 5 \times 10^{-5} \times 5 \times 10^{-5}$. La desviación estándar relativa (% DER) de los factores de respuesta fue menor a 12%. En cuanto a las desviaciones estándar relativas (% DER) de los resultados del estudio de precisión a tres niveles de concentración de la curva de calibración, fueron inferiores a 3% (0.77, 0.86 y 2.61%) para los resultados intradía y 9% (2.35, 2.47 y 8.52%) para la precisión interdía.

Estos resultados demostraron que el método fue preciso. Las recuperaciones se probaron por medio de la adición de estándar a tres niveles de concentración a muestras de *T. diffusa*, con tres réplicas para cada nivel de adición. Las recuperaciones para los niveles bajo, medio y alto fueron 110, 99.4 y 97.1%, respectivamente, y sus precisiones expresadas como % DER fueron de 2.53, 1.85, y 0.94. Se demostró la estabilidad del marcador en las condiciones de almacenamiento por 90 días.

Para establecer la huella dactilar de *T. diffusa*, se probaron tres columnas cromatográficas, dos solventes orgánicos (metanol y acetonitrilo), la adición de TFA a la fase móvil y cambios en el programa de gradiente de elución, como se reportó previamente.¹³ Los criterios empleados para la optimización de las condiciones de separación fueron la reproducibilidad, el tiempo de análisis y el número de picos. El método desarrollado fue validado con los siguientes parámetros: a) precisión, la cual fue evaluada por el % DER de los t_R , áreas y alturas relativas de las señales de mayor intensidad (16 señales). El % DER intradía, tanto para las áreas como para las alturas relativas, fue menor de 8%, y los % DER interdía menores a 10%. b) Como criterio de selectividad se emplearon el tiempo de retención y el espectro de absorción obtenido en el ápex de cada señal, después de la sustracción de la línea base. c) Robustez, los ensayos mostraron que pequeños cambios en la concentración del TFA, temperatura de la columna y especialmente en la proporción de metanol, causan cambios significativos en los tiempos de retención al nivel de significancia empleado (95%).

d) Estabilidad, la cual fue evaluada con gráficas control construidas con los datos obtenidos del análisis de precisión, con un límite de ± 2 desviaciones estándar. Los resultados mostraron que la solución del extracto fue estable hasta el día 60 posterior a su preparación, cuando se almacenó a 4°C.

Se identificaron catorce picos comunes presentes en las 19 colectas de *T. diffusa* (figura 2). Posteriormente se estableció un modelo quimiométrico por PCA, empleando las áreas relativas de las señales comunes en las diferentes muestras de *T. diffusa*. El PCA es una técnica quimiométrica ampliamente usada para el análisis de datos multivariantes, como los datos cromatográficos.¹⁴ Para la construcción del modelo se trabajó con una matriz inicial de 19 muestras (muestras de plantas nativas colectadas) y catorce variables (áreas relativas de las catorce señales comunes), con el programa Uscramble 9.8 (Umetrics). Los dos primeros picos, al no resolverse bien en el sistema cromatográfico, aumentaban en forma importante la varianza de los datos, por lo que se les excluyó del modelo. El nuevo modelo consistió en una matriz de datos de 19 muestras \times doce variables. Todas las variables tienen una contribución similar a la varianza de los datos.

Una vez establecido el modelo, se obtuvieron las huellas dactilares de cada uno de los 40 extractos nativos. La precisión intradía del método cromatográfico utilizado para obtener las huellas dactilares se evaluó, considerando los datos de los tiempos de retención, alturas y áreas relativas de las doce señales comunes en los diferentes extractos. Los resultados de precisión, expresados como % DER, estuvieron entre 0.1 a 2.8% para los tiempos de retención, 2.35 a 12% para las áreas relativas, y 2.61 a 16% para las alturas relativas.

Los desplazamientos de los tiempos de retención en cromatografía son frecuentes, debido a causas como variaciones en la composición de la fase móvil, temperatura, flujo, edad de la columna o variaciones instrumentales, por lo que se recomienda alinear los cromatogramas antes de lle-

var a cabo el análisis quimiométrico. En nuestro caso, la alineación de los cromatogramas se realizó con base en siete señales presentes en todas las muestras analizadas, con intensidades relativamente altas.

Por último, para estudiar la correlación entre actividad antioxidante y perfil cromatográfico, un set de calibración de 40 muestras se empleó para establecer los modelos PLS1. En todos los casos la variable de predicción "Y" fue el valor de la actividad antioxidante de los extractos. Cada análisis se realizó por triplicado, los resultados mostraron % DER, entre 0.1 y 18.1%. Para evitar sobreajustes del modelo, se empleó la técnica de validación cruzada para construir los modelos PLS1, en la que una muestra se remueve del set de calibración, y el modelo de PLS se calibra con los datos restantes.

Los mejores resultados se obtuvieron con los cromatogramas en orden cero suavizados con cinco puntos. Para la construcción del modelo fueron excluidas de los cromatogramas originales las variables correspondientes a los tiempos de retención, entre 3.3 a 4.5, y posteriores a los 35 minutos. Bajo estas condiciones, el número de componentes óptimos para el PLS1 fue de 5. En la figura 3 se muestra la gráfica de correlación entre los valores medidos y de predicción de la actividad para cada una de las muestras usadas para la

Tabla I. Predicción de la actividad antioxidante de seis productos comerciales.

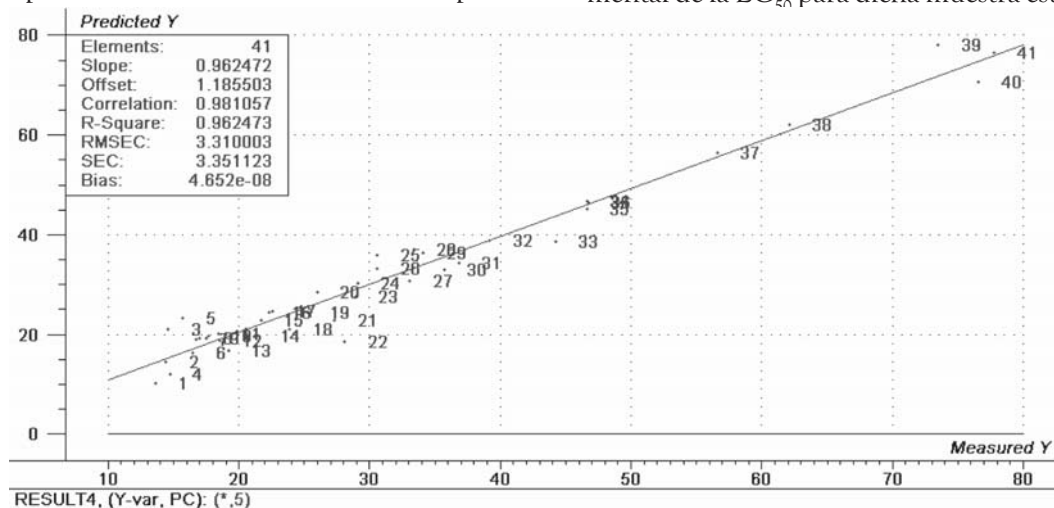
Muestra	Predicción	Desviación	Experimental	DPR
B-1	36,5	7,1	39,9	-8,4
B-2	36,2	10,3	94,5	-61,7
B-3	35,6	8,4	41,8	-14,9
Cal	22,0	10,4	30,1	-26,9
SLP	34,2	8,3	48,7	-29,8
DF	21,0	9,1	20,9	0,5

DPR: diferencia porcentual relativa; B = Barcelona, España; Cal = California; SLP = San Luis Potosí; DF = Distrito Federal.

calibración del método quimiométrico optimizado.

El modelo establecido y validado se aplicó a la predicción de la capacidad antioxidante de seis productos comerciales, a partir del perfil cromatográfico. Las muestras se procesaron de igual manera que las plantas. Los resultados de predicción se compararon con los datos de actividad antioxidante obtenidos experimentalmente, y se presentan en la tabla I. Las diferencias porcentuales relativas entre los valores experimentales y los predictivos se presentan en la misma tabla.

Los resultados de predicción de actividad antioxidante para cinco de los seis productos analizados coinciden con los encontrados experimentalmente. La falta de capacidad del modelo para predecir la actividad antioxidante de la muestra B-2 puede justificarse, dado que el valor experimental de la EC_{50} para dicha muestra estaba fuera



del intervalo de las muestras empleadas en la construcción del modelo (14,6 -77,8).

Conclusiones

Se desarrollaron y validaron métodos analíticos para el control de calidad de *T. diffusa* (damiana). Por un lado, se aisló un flavonoide C-glicosilado, que resultó ser un buen marcador de la planta, por haber sido hasta ahora aislado de esta planta y estar presente en todos los ejemplares analizados por nosotros. Al emplear este compuesto como estándar y HPLC/DAD como técnica, se desarrolló un método analítico reproducible y exacto, que proponemos sea aplicado como control de calidad de los productos que contienen damiana. Por otro lado, se estableció y validó un perfil cromatográfico de la planta, el cual fue además correlacionado con la actividad antioxidante, para desarrollar un modelo que permite predecir la actividad antioxidante de los extractos de damiana a partir de sus datos cromatográficos. Todos estos métodos se podrán aplicar en un futuro inmediato para generar extractos estandarizados de damiana, que pudieran utilizarse en ensayos clínicos, como paso fundamental para desarrollar fitofármacos a partir de esta planta medicinal.

Resumen

Para desarrollar protocolos clínicos de productos herbales es necesario contar con productos estandarizados de calidad consistente. Para ello se requiere el desarrollo de una metodología analítica que asegure la calidad y reproducibilidad de estos productos. Damiana (*Turnera diffusa*) es una planta medicinal utilizada en México como afrodisíaca, antidepresiva, termogénica, etcétera. Nuestro grupo ha demostrado su actividad antioxidante y hepatoprotectora. No hay métodos analíticos que permitan su control de calidad. En el presente trabajo se realizó un desarrollo analítico integral de *T. diffusa*, que inició con el aislamiento, purifi-

cación e identificación de un biomarcador de la planta, y continuó con el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC-DAD para cuantificar dicho biomarcador, que puede servir para su control de calidad. Además, se estableció una huella dactilar cromatográfica de la planta que sirve para el establecimiento de su identidad en productos comerciales que la contengan. Por último, se estableció un modelo que permite predecir la actividad antioxidante de la planta a partir de su perfil cromatográfico. Todos estos métodos permitirán generar extractos estandarizados de damiana que pudieran utilizarse en ensayos clínicos, como paso fundamental para desarrollar fitofármacos, a partir de esta planta medicinal.

Palabras clave: Damiana, *Turnera diffusa*, Control de calidad, Antioxidantes, HPLC.

Abstract

In order to develop clinical trials with herbal products, it is necessary to have standardized extracts with consistent quality. To accomplish this, the development of analytical methods that could assure the quality and reproducibility of herbal extracts is required. Damiana (*Turnera diffusa*) is a medicinal plant widely used in México as an aphrodisiac, anti-depressant, thermogenic agent, among others. Our research team demonstrated its potential as antioxidant and hepatoprotective. Up to now, no analytical method is available for quality control of Damiana. In the present contribution an integral analytical development of *T. diffusa* is presented, which began with the isolation, purification, and identification of a biomarker for this plant, followed by the development of an HPLC-DAD analytical method for its quantification that could be useful for quality control. Furthermore, the chromatographic fingerprint of the plant was obtained, which could be used for authenticity of commercial samples containing Damiana. Finally, a model that could predict the antioxidant activity

from the chromatographic fingerprint was also developed. All of these methods will allow the generation of standardized extracts which could be used in clinical trials as a fundamental step toward development of phytopharmaceuticals from this plant.

Keywords: Damiana, *Turnera diffusa*, Quality control, Antioxidants, HPLC.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de Conacyt (53877) y Paicyt (SA1644-07) para la realización del presente trabajo.

Referencias

- Cañigual, S. (2002). La fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*, 2, 101-121.
- Whelan A., Jurgens, M., Lord, L. (2009). Evaluating the Quality of Randomized Controlled Trials that Examine the Efficacy of Natural Health Products: A Systematic Review of Critical Appraisal Instruments. *eCAM*, 6, 441-448.
- Wolsko, P., Solondz, D., Phillips R., Schachter S., Eisenberg D. (2005). Lack of herbal supplement characterization in published randomized controlled trials. *The American Journal of Medicine*, 118, 1087-1093.
- Ramírez, R., Cenicerós, L., Salazar, R., Salazar, M.L., Waksman N. (2009). Salazar, M.L., Waksman, N. (2009). Development and validation of thin layer chromatographic methods for quality control of herbal products. *Acta Chromatographica*, 21, 203-215.
- Adame, J., Adame, H. (2000). Plantas curativas del noreste mexicano. Editorial Castillo, México. Primera edición, p. 123.
- Alcaraz, L.; Delgado, J.; Real, S. (2004) Analysis of essential oils from wild and micropropagated plants of damiana (*Turnera diffusa*). *Fitoterapia*, 75, 696-701.
- Salazar, R., Pozos M.E., Cordero, P., Pérez, J., Salinas, M.C., Waksman N. (2008). Determination of the antioxidant activity of plants from Northeast México *Pharmaceutical Biology*, 46, 166-170
- Pérez, J., Garza, A., Salazar, R., Salazar, M.L., Waksman, N. (2010). Development and validation of an HPLC-DAD analytical procedure for quality control of damiana (*Turnera diffusa*) using an antioxidant marker isolated from the plant. *J AOAC International*, 93, 161-1168.
- Leu, S.J., Lin, Y.P., Lin, R.D., Wen, C.L., Cheng, K.T., Hsu, F.L., Lee, M.H. (2006). Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. *formosana* in the field of skin care. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 740-745.
- Zhao, J., Pawar, R.S., Ali, Z., Khan, I.A. (2007). Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *Journal of Natural Products*, 70, 289-292.
- AOAC International. (2003). Official methods of analysis of AOAC Int. 17th edition. 2nd revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Garza, A., Waksman, N., Ramírez, R., Salazar, M.L. (2009). Development and validation of fingerprints of *T. diffusa* extracts obtained by use of HPLC with DAD and chemometric methods. *Acta Chromatographica*, 21, 217-235.
- Miller, J., Miller, J. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Editorial Pearson, Madrid. 4ª edición, pp. 221-243.

Recibido: 01 agosto 2010

Aceptado: 01 septiembre 2010